

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

***Cordia curassavica* (JACQ.) ROEM. & SCHULT.:**
Influência de fatores ambientais no crescimento e na
produção de metabólitos.

FLÁVIA SIMÃO LAPA

Florianópolis

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

***Cordia curassavica* (JACQ.) ROEM. & SCHULT.:
Influência de fatores ambientais no crescimento e na
produção de metabólitos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Maria Terezinha S. Paulilo

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Miriam de Barcellos Falkenberg

FLÁVIA SIMÃO LAPA

Florianópolis, junho 2006.

“Todo conhecimento tem uma finalidade. Saber por saber, por mais que se diga ao contrário, não passa de um contra-senso”

Miguel de Unamuno

**Dedico esta dissertação aos meus pais,
ao meu marido e ao meu filho...**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida; às professoras Maria Terezinha Silveira Paulilo e Miriam de Barcellos Falkenberg pela orientação e compreensão; aos pesquisadores do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agronômicas da Unicamp e à professora Dra. Maike Petersen da Universidade Marburg, pelos materiais cedidos para a realização desta pesquisa; aos colegas, pelo tempo que disponibilizaram; aos agricultores das Associações de Desenvolvimento das Microbacias Rio D'una e Rio das Cachoeiras, que aguardaram a conclusão desta etapa; aos tios, sogros, avós e irmãos, que apoiaram, rezaram e acompanharam; aos meus pais, pelo caráter que me deram; ao Fabrício por me ajudar e incentivar e ao Kaio por me aguardar.

Obrigada.

RESUMO

A *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. (Boraginaceae) tem como sinonímia científica *Cordia verbenacea* DC. e é conhecida popularmente como erva baleeira. Popularmente utilizada para tratamento de reumatismo, inflamação e promover a cicatrização. É uma espécie ocorrente no Domínio da Mata Atlântica e vegeta preferencialmente em terrenos arenosos e ensolarados, como restingas, dunas e praias. As principais substâncias presentes na *C. curassavica* com ação antiinflamatória são a artemetina e o α -humuleno, porém sabe-se que além dessas existem outras substâncias antiinflamatórias presentes nesta planta, como o ácido rosmarínico, que é um metabólito secundário comum na família Boraginaceae, mais facilmente encontrado em extratos alcoólicos do que no óleo essencial. O ambiente de crescimento da planta pode influenciar na composição de seus compostos químicos de uso medicinal e na quantidade de material vegetal. Este estudo procurou verificar a influência de três intensidades de luz (100%, 70% e 20% da luz solar) e de substratos com dois níveis de fertilidade (areia de duna e um substrato composto de solo argiloso, areia de rio e composto orgânico termofílico) no crescimento, composição e quantidade de compostos químicos em *C. curassavica*. Os resultados indicaram que maior intensidade de luz: (1) aumentou a massa seca da raiz e diminuiu a área foliar; (2) aumentou o rendimento relativo dos extratos éter de petróleo e etanólico e o rendimento relativo total; (3) aumentou ou diminuiu, dependendo da substância, apenas duas substâncias das nove detectadas na cromatografia de camada delgada; (4) aumentou a atividade biológica (avaliada pela toxicidade dos extratos etanólicos para larvas de *Artemia salina*). O substrato mais fértil: (1) aumentou a massa seca total e a área foliar e proporcionou maior valor da taxa de crescimento relativo para as plantas; (2) aumentou o rendimento relativo dos extratos éter de petróleo e etanólico e o rendimento relativo total; (3) não influenciou a intensidade ou número de metabólitos detectados em cromatografia de camada delgada (CCD), no extrato etanólico, nem interferiu na atividade biológica desse extrato. Face ao exposto, este estudo mostra que a alta intensidade de luz solar aumenta a produção de metabólitos em *C. curassavica*, mas não a biomassa de folhas. Enquanto que solos de maior fertilidade aumenta a produção de metabólitos e da biomassa de folhas - órgão utilizado para extração de metabólitos neste estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Massa seca e área foliar de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas sob diferentes intensidades de luz.....	19
Tabela 2.	Taxa média de crescimento relativo (TCR), razão média de área foliar (RAF) e relação raiz:parte aérea (R:PA) de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas sob diferentes intensidades de luz.....	20
Tabela 3.	Valores de massa seca e área foliar de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas sob diferentes substratos.....	21
Tabela 4.	Taxa média de crescimento relativo (TCR), razão média de área foliar (RAF) e relação raiz:parte aérea (R:PA) de plantas de <i>C. curassavica</i> crescidas sob diferentes substratos.....	21
Tabela 5.	Rendimentos relativos dos extratos de plantas crescidas em diferentes intensidades luminosas.....	22
Tabela 6.	Rendimentos relativos de extratos de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas em diferentes substratos.....	23
Tabela 7.	Intensidade das diferentes substâncias detectadas na cromatografia em camada delgada, para extratos etanólicos preparados a partir de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas em diferentes intensidades luminosas.....	24
	...	
Tabela 8.	Intensidade das diferentes substâncias detectadas na cromatografia em camada delgada, para extratos etanólicos preparados a partir de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas em diferentes substratos.....	25
Tabela 9.	Número de metabólitos majoritários visualizados em CCD dos extratos etanólicos de plantas de <i>Cordia curassavica</i> crescidas em diferentes intensidades luminosas ou substratos.....	26
Tabela 10.	Dados individuais do número de metabólitos visualizados, em cada amostra, na CCD do extrato etanólico de folhas de <i>Cordia curassavica</i> , cultivadas em diferentes intensidades luminosas.....	27
Tabela 11.	Dados individuais do número de metabólitos visualizados, em cada amostra, na CCD do extrato etanólico de folhas de <i>Cordia curassavica</i> , cultivada em substratos diferentes.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo da sequência da preparação dos extratos brutos. EP: éter de petróleo; CL: clorofórmio; ET: etanol	14
Figura 2.	Esquema representativo da preparação das diluições dos extratos para obtenção das concentrações finais.....	17
Figura 3.	Sequência das etapas para o bioensaio com <i>Artemia salina</i>	18
Figura 4.	Cromatografia em camada delgada de extratos etanólicos de plantas cultivadas em diferentes intensidades de luz. Placa de gel de sílica eluída em clorofórmio, metanol e água na proporção 30:11:2 e observada após revelação com anisaldeído-sulfúrico.....	29
Figura 5.	Cromatografia em camada delgada de extratos etanólicos de plantas cultivadas em diferentes substratos. Placa de gel de sílica eluída em clorofórmio, metanol e água na proporção 30:11:2 e observada após revelação com anisaldeído-sulfúrico.....	30
Figura 6.	Concentração Letal Média (CL ₅₀) de extratos etanólicos de plantas cultivadas em 100% de luz, 70% de luz e 20% de luz.....	31
Figura 7.	Concentração Letal Média (CL ₅₀) de extrato etanólico de plantas cultivadas em areia de duna e solo (composto orgânico, areia de rio e solo argiloso).....	32

SUMÁRIO

Resumo	VI
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	VIII
 1. Introdução	
1.1. Importância das plantas medicinais	01
1.2. Importância da qualidade das plantas medicinais	02
1.3. Metabólitos ativos	03
1.4. Fatores que influenciam o crescimento de plantas e a produção de metabólitos	04
1.5. <i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	05
 2. Objetivos	09
2.1. Objetivo geral	09
2.2. Objetivos específicos	09
 3. Materiais e Métodos	
3.1. Local e época dos experimentos	10
3.2. Material vegetal	10
3.3. Obtenção de plântulas	10
3.4. Condições de crescimento de plantas em diferentes intensidades de luz	11
3.5. Condições de crescimento de plantas em diferentes substratos	12
3.6. Avaliação de parâmetros morfológicos e fisiológicos	12
3.6.1. Determinação de massa seca e área foliar	12
3.6.2. Determinação da taxa de crescimento relativo, da razão de área foliar e da razão raiz/parte aérea	12
3.7. Obtenção de extratos brutos e rendimento de folhas	13
3.8. Determinação da composição química qualitativa e quantitativa dos extratos brutosetanólicos	15
3.9. Avaliação da toxicidade de extratos vegetais	15
3.10. Análise estatística	18

4. Resultados	
4.1. Efeitos de diferentes intensidades de luz no crescimento de plantas	19
4.2. Efeitos de diferentes substratos no crescimento de plantas	20
4.3. Efeitos de intensidades de luz nos rendimentos relativos dos extratos vegetais	22
4.4. Efeitos do substrato nos rendimentos relativos dos extratos vegetais	23
4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD) de extrato etanólico	24
4.5.1. Intensidade das manchas na CCD para extratos de plantas cultivadas em diferentes intensidades luminosas	24
4.5.2. Intensidade das manchas na CCD para extratos de plantas cultivadas em diferentes substratos	25
4.5.3. Número de metabólitos majoritários detectados na CCD dos extratos etanólicos das folhas crescidas em diferentes intensidades de luz ou substratos	25
4.6. Atividade biológica do extrato etanólico: toxicidade para larvas de <i>Artemia salina</i>	31
5. Discussão	
5.1. Efeitos de diferentes intensidades de luz no crescimento de plantas	33
5.2. Efeitos de diferentes substratos no crescimento de plantas	34
5.3. Efeitos de diferentes intensidades de luz na composição e atividade dos extratos de <i>Cordia curassavica</i>	35
5.3.1. Rendimento de extratos	35
5.3.2. Produção de metabólitos majoritários	37
5.3.3. Toxicidade dos extratos	38
5.4. Efeitos de diferentes substratos na composição e atividade dos extratos de <i>Cordia curassavica</i>	39
5.4.1. Rendimento de extratos	39
5.4.2. Produção de metabólitos majoritários	40
5.4.3. Toxicidade dos extratos	41
6. Conclusões	42
7. Referências Bibliográficas	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das plantas medicinais

Plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas (TYLER, 1994).

No Brasil observa-se um crescimento do consumo de plantas medicinais e de medicamentos à base de plantas em todas as classes sociais. A demanda maior de medicamentos fitoterápicos consumidos é para tratamento de problemas do sistema nervoso central, do trato digestivo e de doenças respiratórias (NOGUEIRA & WOLFF, 2001).

Dentro do mercado mundial de produtos biotecnológicos que movimenta entre 470 a 780 bilhões de dólares anuais o setor de medicamentos alopáticos movimenta de 75 a 150 bilhões de dólares/ano, o setor de fitoterápicos, de 20 a 40 bilhões de dólares/ano e o de cosméticos de 2,6 a 2,8 bilhões de dólares/ano (ARNT, 2001). No Brasil, o comércio de plantas medicinais movimenta cerca de 800 milhões de dólares (NOGUEIRA & WOLFF, 2001).

Com a demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo dessas plantas torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional (CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1994)

A transformação de plantas em medicamentos esbarra na dificuldade de obtenção, de matéria prima na qualidade e na quantidade necessária para a fabricação (ANTÔNIO, 1997). O extrativismo de plantas medicinais nas florestas é a principal forma de obtenção de matéria prima para fitoterápicos. Como consequência ocorrem problemas ambientais que têm colocado em risco a integridade e a manutenção dos ecossistemas. Ademais, algumas espécies nativas estão sofrendo erosão genética acelerada, principalmente pela

perda de variabilidade, consequência direta do alto volume de extração em seus ambientes naturais (ORELLANA *et al.*, 1994). A coleta de plantas medicinais não é tão simples quanto foi em épocas passadas, dadas a importância que o conhecimento da biodiversidade vem tendo atualmente, a preocupação que a sociedade vem com o meio ambiente e a legislação específica que governos vêm adotando. Hoje, em muitas situações, são necessárias permissões dos órgãos governamentais responsáveis para a extração de plantas (MING, 1996).

Foi regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária na Resolução-RDC N° 48, de 16/03/2004 (BRASIL, 2000). Para o registro de novos fitoterápicos, essa Resolução exige dados botânicos, agronômicos, microbiológicos, químicos e farmacológicos, além de outras informações que contribuam para evidenciar a eficácia e a segurança do seu uso. Os fitoterápicos já registrados dispõem de um período de tempo para adaptar-se às novas normas e renovar o registro.

1.2. Importância da qualidade das plantas medicinais

Embora a RDC 48/2004 seja dirigida aos fabricantes de fitoterápicos, ela vem dando nova dimensão às relações comerciais entre os produtores rurais, as firmas distribuidoras, os laboratórios e as farmácias.

A qualidade de um medicamento começa com a matéria-prima usada para fabricá-lo, portanto a qualidade de um fitoterápico começa no campo. Num sistema de cultivo de planta medicinal a qualidade é determinada por sua base genética e pelo ambiente onde se desenvolve (MAGALHÃES, 2001).

O uso de plantas medicinais como matéria-prima para a fabricação de medicamentos só se firmará legalmente se tiver matéria-prima em quantidade e qualidade necessária. Para

isso é preciso ter plantas devidamente identificadas e com produção uniforme, obter matéria-prima sem contaminantes e poder quantificar os metabólitos ativos presentes (MONTANARI, 2001; MAGALHÃES, 2001).

1.3. Metabólitos ativos

As substâncias químicas produzidas pelas plantas são conhecidas como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todas as células vegetais, por serem essenciais para vida de qualquer planta, exemplos são os açúcares simples, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucléicos. Os metabólitos secundários não são considerados essenciais, porém são importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem. Muitos deles funcionam como sinais químicos que permitem à planta responder a estímulos ambientais, outros funcionam em defesa da planta contra herbívoros, patógenos ou competidores, enquanto alguns fornecem proteção contra a radiação solar e outros contribuem para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN *et al.*, 2001). Dentre os metabólitos secundários é que se encontram os metabólitos ativos, ou seja, com atividade farmacológica (SANTOS, 1999), denominados de princípios ativos.

Através da pesquisa fitoquímica é possível identificar as substâncias químicas de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente. Por exemplo, quando se deseja extrair substâncias como lipídeos, ceras, pigmentos e furanocumarinas se utiliza o éter de petróleo ou hexano como solvente da extração. Quando se deseja obter bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos, utiliza-se clorofórmio, tolueno ou ainda diclorometano como solvente na extração. Já quando o objetivo da extração é obter heterosídeos utiliza-se etanol ou metanol como solvente na extração.

Porém, sabe-se que praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em etanol (MACHADO *et al.*, 1999).

1.4. Fatores que influenciam o crescimento de plantas e a produção de metabólitos

Fatores ambientais como a disponibilidade de água, de luz e de nutrientes, influenciam no crescimento de plantas. Com alteração do regime de luz ou nutricional, as espécies costumam mostrar alterações morfo-fisiológicas para maximizar o ganho de massa seca nas novas condições. Entre estas alterações morfo-fisiológicas estão variações na distribuição de biomassa entre raiz e parte aérea, na taxa de assimilação líquida de carbono e na razão de área foliar (OSUNKOYA *et al.*, 1994). Sob regime de luz não limitante as espécies tendem a favorecer o crescimento de raiz, a apresentar maiores taxas de crescimento e de assimilação líquida de carbono (OSUNKOYA *et al.*, 1994), a aproveitar melhor um aumento nutricional (PEACE & GRUBB, 1982). Sob regimes nutricionais não limitantes as espécies, normalmente, apresentam maior crescimento, com menor razão raiz/parte aérea (GUNATILLEKE *et al.*, 1997).

A natureza e a quantidade de metabólitos produzidos durante o desenvolvimento do vegetal podem ser afetadas pela luz, pela temperatura, pela precipitação, pelos ventos fortes, pela altitude, pelo solo, pela época de coleta, pela idade da folha, por eventos fenológicos, pelo acúmulo de nitrogênio foliar, pela herbivoria, por injúria física e outras formas de estresse (EVANS, 1991; VITTI & BRITO, 1999; SIMÕES & SPITZER, 1999; LARCHER, 2000; CALIXTO, 2001; GOUINGUENÉ & TURLINGS 2002; GUENTHER, 1997). LINCOLN & LANGENHEIM (1978) estudaram *Satureja douglasii* (Benth.) Briq. sob diferentes intensidades luminosas e observaram que com baixa intensidade luminosa houve redução do conteúdo de monoterpenos por peso seco. CROTEAU (1992) observou que o conteúdo de óleo essencial de *Hedeoma drummondii* Benth. foi reduzido em 50% sob

luminosidade baixa. BERNÁTH (1992) verificou que a sombra reduz a concentração do mentol e do óleo volátil de *Mentha piperita* L. Estudos realizados com milho demonstraram também que a fertilização afeta fortemente a emissão de substâncias voláteis (GOUINGUENÉ & TURLINGS, 2002).

1.5. *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult.

Essa planta é popularmente conhecida por erva-baleeira, erva-balieira, salicilina, salicina, caraminha, caramoneira-do-brejo, balieira branca, catinga-preta, balieira-cambará, camaradinha ¹. As folhas dessa planta são empregadas popularmente no litoral de São Paulo, Paraná e Santa Catarina na elaboração de extrato alcoólico para curar reumatismo, inflamação e promover cicatrização (AKISUE *et al.*, 1983; SERTIÉ *et al.*, 1991).

Cordia curassavica pertence à família Boraginaceae e tem como sinónímias científicas: *Cordia verbenacea* DC., *Cordia salicina* DC, *Cordia curassavica* auctt. bras. Ex Fresen, *Cordia cylindristachia* auctt. bras. Ex Fresen, *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* Kuntze e *Lithocardium verbaceum* Kuntze (LORENZI, 2002). A maioria dos artigos nacionais encontrados refere-se à espécie como *Cordia verbenacea*, utilizando como referência SMITH (1970). Cabe, entretanto, destacar que este autor não era um especialista no grupo taxonômico, ao contrário de SÁNCHEZ (1995), que em seu trabalho de revisão do gênero *Cordia* adotou o binômio *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. como o mais correto, considerando *C. verbenacea* DC. como sua sinónimia. Dentro da tradição de adotar as posições de especialistas que revisem os grupos, a posição de Sánchez foi aceita também por taxonomistas brasileiros.

¹ Esses dois últimos nomes também são usados para espécies de *Lippia l.* e de *Lantana l.*

Ocorre em altitudes que variam do nível do mar até os 2.000 m de altitude. Cresce abundantemente sobre solos arenosos e pedregosos em praias, formando parte da vegetação secundária de matas subxerofíticas alteradas (SÁNCHEZ, 1995). É encontrada desde a América Central até o sul do Brasil, sendo característica da restinga litorânea do Ceará até o RGS. Na região Sul, ocorre comumente em restingas subarbustivas ou arbustivas, onde cresce na duna frontal, ou em dunas internas e planícies arenosas enxutas, bem como em costões rochosos junto às restingas. Raramente pode ser observada mais para o interior do continente, em pequenos morros, desenvolvendo-se nas capoeiras, em solos úmidos (SMITH, 1970).

C. curassavica é um arbusto aromático, possui cheiro forte e característico, mas não desagradável (AKISUE et al., 1983; LORENZI, 2002). Para algumas pessoas o cheiro lembra o aroma dos cubinhos de caldo de carne, razão pela qual a planta é chamada em inglês de “maggy plant” (MONTANARI, 2000). Arbustos de 0,5 a 4 metros, eretos, com ramos dispostos helicoidalmente. Suas folhas são simples, alternas, coriáceas, aromáticas, com 5-9 cm de comprimento, a margem denteada, superfície superior verde-escura e áspera e superfície inferior branca e tomentosa. Inflorescências terminais em espiga, às vezes agrupadas em panículas; cálice gamossépalo, campanulado, verde, cerca da metade do comprimento das pétalas, lobos triangulares; corola gamopétala, infundibuliforme, branca, 4-7 mm (SMITH, 1970, SÁNCHEZ, 1995). Os frutos são cariopses esféricas, de coloração vermelha quando maduras (AKISUE et al., 1983; LORENZI, 2002). Trata-se de um táxon muito variável quanto ao tamanho das folhas e inflorescências; todos os morfótipos têm em comum a corola pentalobulada com limbo patente ou revoluto (SÁNCHEZ, 1995).

C. curassavica vegeta preferencialmente em terrenos arenosos como restingas, dunas e praias. Floresce durante os oito meses mais quentes do ano. Seu florescimento e frutificação são irregulares. As flores são muito visitadas por abelhas africanizadas, himenópteros, moscas e borboletas. Seus pequenos frutos vermelhos são comestíveis e muito procurados por

pássaros de diversas espécies que, involuntariamente, fazem a dispersão das sementes. É comum a incidência de formigas cortadeiras, que causam sérios danos à planta. Larvas de coleópteros da família *Carabidae*, que se alimentam do limbo das folhas, também podem causar danos à planta (MONTANARI, 2000).

A propagação pode ser por sementes, por estacas e por micropropagação (MAGALHÃES, 1997; MATTOS, 1996; FIGUEIRA *et al.*, 2001). As sementes devem ser coletadas no estágio de frutos vermelhos, pois logo após ocorre a ovoposição generalizada de um micro-himenóptero, cuja larva destrói o embrião (MAGALHÃES, 1997). A semeadura pode ser realizada em tubetes, após remoção do arilo das sementes, que inibe a germinação. Segundo MONTANARI (2000), as sementes germinam de 20 a 50 dias após a semeadura.

Por ser uma espécie em início de domesticação, ainda não existem cultivares nem tecnologias de cultivo desenvolvidas para *C. curassavica*, e ainda não são conhecidos os melhores climas, solos, pH e as necessidades de adubação para ela. Entretanto, de acordo com observações realizadas no Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrônômicas/UNICAMP, a espécie necessita de solo fértil, levemente ácido e com boa drenagem para se desenvolver bem (MONTANARI, 2000).

Vários pesquisadores já estudaram ou vêm estudando as características químicas e o potencial medicinal da *C. curassavica*. LINS *et al.* (apud KAUFFMANN, 2002) isolaram do extrato etanólico o β -sitosterol e duas flavonas, sendo uma delas a artemetina. VELDE *et al.* (1982), estudando o extrato acetônico das folhas, isolaram dois novos triterpenos, denominados cordialina A e cordialina B. IOSET *et al.* (2000) identificaram quatro naftoquinonas (cordiaquinonas A, B, J e K) nos extratos diclorometânicos das raízes de *C. curassavica*.

Testes realizados em cobaias para avaliar as atividades biológicas dos extratos da *C. curassavica*, e em especial da artemetina, revelaram que houve significativa inibição da inflamação (BASILE *et al.*, 1989; SERTIÉ *et al.*, 1991). As cordiaquinonas A, B, J e K, apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum*, *Candida albicans* e toxicidade para larva do mosquito *Aedes aegypti*.

Este trabalho pretendeu investigar o efeito dos fatores ambientais luz e nutrientes na produção de biomassa e na produção de substâncias químicas extraíveis por éter de petróleo, clorofórmio e etanol em folhas de *C. curassavica*. Também pretendeu investigar o efeito da luz e nutrientes na toxicidade do extrato etanólico de folhas. O conhecimento da influência dos fatores luz e nutrientes no crescimento e produção de metabólitos em *C. curassavica* poderá contribuir para que pequenos produtores obtenham melhor produtividade no cultivo desta espécie, o que lhes poderá trazer benefícios comerciais e financeiros ao produzirem plantas medicinais de melhor qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a influência dos fatores ambientais luz e nutrientes no crescimento e na produção da planta *Cordia curassavica*, tendo em vista a obtenção de informações sobre melhores condições de cultivo desta planta, para obtenção de maior quantidade de biomassa e produtos do metabolismo secundário.

2.2. Objetivos específicos

Considerando a influência de três intensidades de luz e dois níveis nutricionais do substrato no crescimento das plantas, avaliar a:

- i. massa seca, área foliar, taxa de crescimento e alocação de biomassa entre órgãos;
- ii. rendimento relativo de extratos em éter de petróleo, clorofórmio e etanol;
- iii. perfil quali-quantitativo em cromatografia em camada delgada do extrato etanólico; e
- iv. toxicidade do extrato etanólico para larvas de *Artemia salina* Leach..

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e época dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Botânica da UFSC, na cidade de Florianópolis/SC, durante os meses de março a outubro de 2005.

3.2. Material vegetal

As plantas cultivadas e analisadas no âmbito deste trabalho foram obtidas a partir de sementes provenientes de frutos de *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult., cedidos pelo Profº Drº Pedro Melilo do CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agronômicas) da UNICAMP Paulínea/SP, originários de plantas lá cultivadas.

As sementes foram coletadas aleatoriamente em 12 hectares de cultivo de *C. curassavica* existente no CPQBA. As matrizes do CPQBA não sofreram nenhum processo específico de melhoramento genético. O único tipo de adubação realizado foi a calagem uma vez ao ano e quando época de estiagem é realizado a irrigação. Este cultivo já existe a 15 anos e ao longo dos anos sempre foram coletadas as sementes mais vigorosas para germinação e levadas a campo as mudas mais bem formadas.

3.3. Obtenção de plântulas

Os frutos foram submersos por 12 h em água, para amolecimento da polpa, sendo posteriormente passados em peneira metálica malha 50 (fubá) Belgo®, de forma a isolar o

pericarpo da semente. As sementes desnudas foram lavadas em água corrente para retirar o restante do pericarpo aderido. A seguir, foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio a 10%, durante 15 minutos e lavadas em água previamente fervida e resfriada. As sementes foram colocadas para germinar a temperatura ambiente, em placas de Petri revestidas com papel filtro umedecido com solução do fungicida Benlate[®] 500 (benzimidazol) na concentração de 100 mg/mL.

As plântulas obtidas da germinação, a qual teve a duração de 10 a 30 dias, foram sendo transplantadas para bandejas contendo areia lavada, onde permaneceram por 30 dias até serem transplantadas para as condições definitivas de crescimento.

3.4. Condições de crescimento de plantas em diferentes intensidades de luz

As plântulas, com cerca de 12 cm de parte aérea, foram transplantadas para sacos plásticos de 4 L, contendo substrato composto de material argiloso², areia de rio e composto orgânico termofílico (obtido na compostagem da UFSC), na proporção de 1:1:1. Os sacos, contendo uma planta cada, foram colocados sob abrigos de 1m x 1m x 1m, confeccionadas com tela sombrite, as quais permitiam a passagem de cerca de 70%³ e 20%⁴ de luz solar incidente. Nos tratamentos em que o nível de luz foi de 100%, as plantas foram colocadas a céu aberto. Os abrigos de sombrite foram colocados, a céu aberto e distanciadas entre si, evitando o auto-sombreamento.

Para cada nível de luz foram utilizadas três unidades amostrais, cada uma contendo seis plantas, totalizando dezoito plantas por tratamento. A disposição das unidades amostrais foi feita ao acaso, através de sorteio.

² Comercialmente vendido para utilização em jardins.

³ Conhecido comercialmente como Sombrite 30%.

⁴ Conhecido comercialmente como Sombrite 80%.

A primeira coleta foi feita logo antes das plantas serem colocadas nos diferentes tratamentos e a segunda, após 72 dias de crescimento das plantas nas diferentes intensidades de luz. A cada coleta utilizaram-se nove plantas de cada tratamento, totalizando-se 27 plantas.

3.5. Condições de crescimento de plantas em diferentes substratos

As plântulas, com cerca de 6 cm de parte aérea, foram transplantadas para sacos plásticos de 4 L, contendo dois tipos de substrato: 1) material argiloso⁵, areia de rio e composto orgânico termofílico (obtido na compostagem da UFSC), na proporção de 1:1:1 e 2) solo arenoso, coletado no Rio Tavares, Florianópolis/SC, habitat natural de *C. curassavica*. Os sacos, contendo uma planta cada, foram colocados a pleno sol.

Para cada tipo de substrato foram utilizadas três unidades amostrais, cada uma contendo seis plantas de cada substrato.

A primeira coleta foi feita logo antes das plantas serem colocadas nos diferentes tratamentos e a segunda coleta, após 201 dias de crescimento das plantas nos diferentes substratos. A cada coleta utilizaram-se nove plantas.

3.6. Avaliação de parâmetros morfológicos e fisiológicos

3.6.1. Determinação de massa seca e área foliar

A massa seca foi determinada por pesagem, após a secagem do material vegetal por 72 horas a 80°C em estufa. A área foliar foi determinada desenhando o contorno das folhas em papel. O contorno em papel de cada folha foi recortado e pesado. Este peso foi comparado por regra de três ao peso de 1 cm² do mesmo papel.

⁵ Comercialmente vendido para utilização em jardins.

3.6.2. Determinação da taxa de crescimento relativo, da razão de área foliar e da razão raiz / parte aérea.

A taxa de crescimento relativo (TCR) e a razão de área foliar (RAF) foram calculadas utilizando-se as equações abaixo, segundo HUNT (1982).

$$TCR = (\ln m_2 - \ln m_1) \div (t_2 - t_1)$$

$$RAF = \{[(A_1 \div m_1) + (A_2 \div m_2)]\} \div 2$$

Em que, m_2 = massa seca da planta na segunda coleta;
 m_1 = massa seca da planta na primeira coleta;
 $(t_2 - t_1)$ = intervalo de tempo entre as coletas;
 A_1 = área foliar da primeira coleta;
 A_2 = área foliar da segunda coleta.

A razão raiz/parte aérea (R:PA) foi obtida, dividindo-se a massa seca de raiz pela massa seca da parte aérea.

3.7. Obtenção de extratos brutos e rendimento de folhas

Todos os extratos dos tratamentos de intensidade de luz foram obtidos a partir de material vegetal da segunda coleta, aos 72 dias para o tratamento de luz e aos 201 dias para o tratamento de substrato. Esta diferença de dias ocorreu devido ao baixo desenvolvimento das plantas cultivadas em solo arenoso, aos 72 dias de tratamento, o que dificultaria os resultados e aumentaria o erro.

Foram utilizadas nove plantas por tratamento para obtenção de extratos. De cada planta foram retiradas três folhas saudáveis inseridas logo abaixo da última folha com expansão máxima. As três folhas de cada planta foram pesadas e picadas, correspondendo a uma amostra. Cada amostra foi colocada em éter de petróleo (EP) na proporção de 1:20 (g/mL), por 48 horas em local escuro, à temperatura ambiente. O extrato obtido em éter de petróleo foi filtrado, com o auxílio de algodão, e armazenado em frascos de vidro de cor âmbar, vedados com filme plástico e colocados em local escuro à temperatura ambiente. O material vegetal,

após extração em éter de petróleo, foi colocado em clorofórmio (CL) por 48 horas. O extrato clorofórmico obtido foi filtrado e armazenado como descrito acima. O resíduo vegetal, depois da extração em clorofórmio foi colocado por 48 horas em etanol (ET), procedendo-se a seguir da mesma maneira descrita acima (KAUFMANN, 2002). A figura 1 mostra um esquema representativo da preparação dos extratos.

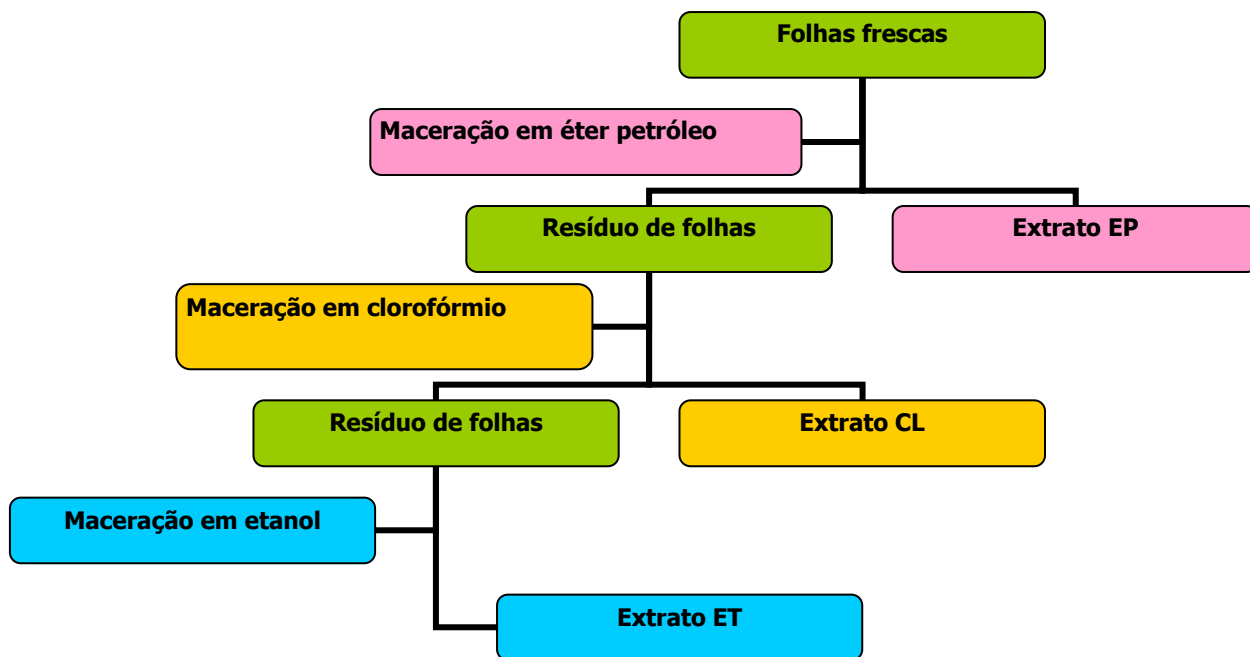


Figura 1. Esquema representativo da sequência da preparação dos extratos brutos das folhas.
EP: éter de petróleo; CL: clorofórmio; ET: etanol

Os solventes éter de petróleo, clorofórmio e etanol foram retirados das soluções extrativas através de evaporador rotatório modelo Laborota 4000 (Heidolph®) com bomba à vácuo Marconi®, com temperatura variando entre 40 e 60°C. A massa seca restante após evaporação do solvente constituiu o extrato bruto. O rendimento bruto de cada amostra foi calculado dividindo-se a massa do extrato bruto pela massa de folhas de cada amostra. O rendimento relativo, que corresponde à quantidade de extrato bruto que seria obtido a partir de 100 g de folhas, foi calculado multiplicando-se a massa do extrato bruto por 100 e dividindo-se o produto obtido pela massa das folhas de cada amostra.

3.8. Determinação da composição química qualitativa e quantitativa do extrato bruto etanólico.

As determinações das composições químicas qualitativa e quantitativa dos extratos brutos foram realizadas segundo FALKENBERG *et al.* (2003), com algumas adaptações.

Os extratos brutos etanólicos foram ressuspensos em etanol, na proporção de 1:20 (m/V), a mesma proporção da solução extrativa. Os extratos foram aplicados em placa de gel de sílica F254 para proceder-se à cromatografia em camada delgada (CCD). Os volumes das alíquotas foram padronizados, 10 µL de cada extrato, e aplicados com o auxílio de tubo capilar padronizado. Ao lado das aplicações das alíquotas do extrato etanólico de *C. curassavica* foi aplicada alíquota de solução padrão de ácido rosmarínico, cedido pela Prof^a Dr^a Maike Petersen, da Universidade de Marburg, Alemanha.

Após eluição cromatográfica das substâncias contida nas alíquotas no sistema de eluentes clorofórmio: metanol: água (30:11:2), as placas foram avaliadas sob luz ultravioleta (UV) de 254 e 365 nm, sendo marcadas a lápis as manchas que apareceram em cada um destes comprimentos de onda. Em seguida as placas foram borrifadas com o revelador anisaldeído-sulfúrico e avaliadas sob luz UV de 254 e 365 nm, sendo marcadas as manchas que apareceram em cada um destes comprimentos de onda.

3.9. Avaliação da toxicidade de extratos vegetais

Fármacos naturais ou sintéticos são quase sempre tóxicos em altas doses, por isso a avaliação da toxicidade de extratos vegetais para organismos de pequeno tamanho pode ser usada como indicativo de atividade biológica (capacidade de interferir em sistemas

biológicos). Muitos grupos de pesquisa têm realizado o bioensaio com cistos de *Artemia salina* Leach. (Artemiidae), um microcrustáceo cosmopolita, pertencente à subclasse Branchiopoda. Após o bioensaio determina-se a concentração letal média (CL₅₀ - concentração que mata 50% dos animais expostos). Este bioensaio consiste na administração de doses de forma a obter-se uma concentração que não mata nenhum dos animais tratados, uma concentração que mata todos os animais tratados e uma terceira concentração intermediária (MC LAUGHLIN, 1991). A dose que mata 50% dos animais tratados (DL₅₀) é obtida por análise de regressão linear do número de indivíduos mortos para cada uma das três concentrações (BRITO, 1996). A quantificação da atividade em termos de DL₅₀ permite inferir sobre a concentração de substâncias potencialmente ativas.

Neste trabalho foi avaliada apenas a toxicidade do extrato etanólico de *C. curassavica*, através do bioensaio de *Artemia salina*, segundo MEYER *et al.* (1982).

Uma alíquota de cada extrato bruto etanólico foi pesada, ressuspensa em etanol e diluída de forma a obter soluções de diferentes concentrações (figura 2).

Os cistos de *A. salina* foram colocados em um aquário sob aeração e controle de temperatura em torno de 25 °C. Após 48 horas de incubação, cerca de 500 mL de água do aquário contendo as larvas foram retirados para o bioensaio.

A cada tubo de ensaio contendo extrato bruto seco (para se obter concentrações de 50, 100 e 200 µg de extrato /mL de água do mar), foram adicionados 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Com o auxílio de uma pipeta foram transferidas 10 larvas (suspensas em água do mar) para cada tubo de ensaio. O volume do tubo foi completado para 5 mL com água do mar. As larvas foram deixadas por 24 horas nestas soluções, quando então foi feita a contagem do número de larvas sobreviventes. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos (figura 3).

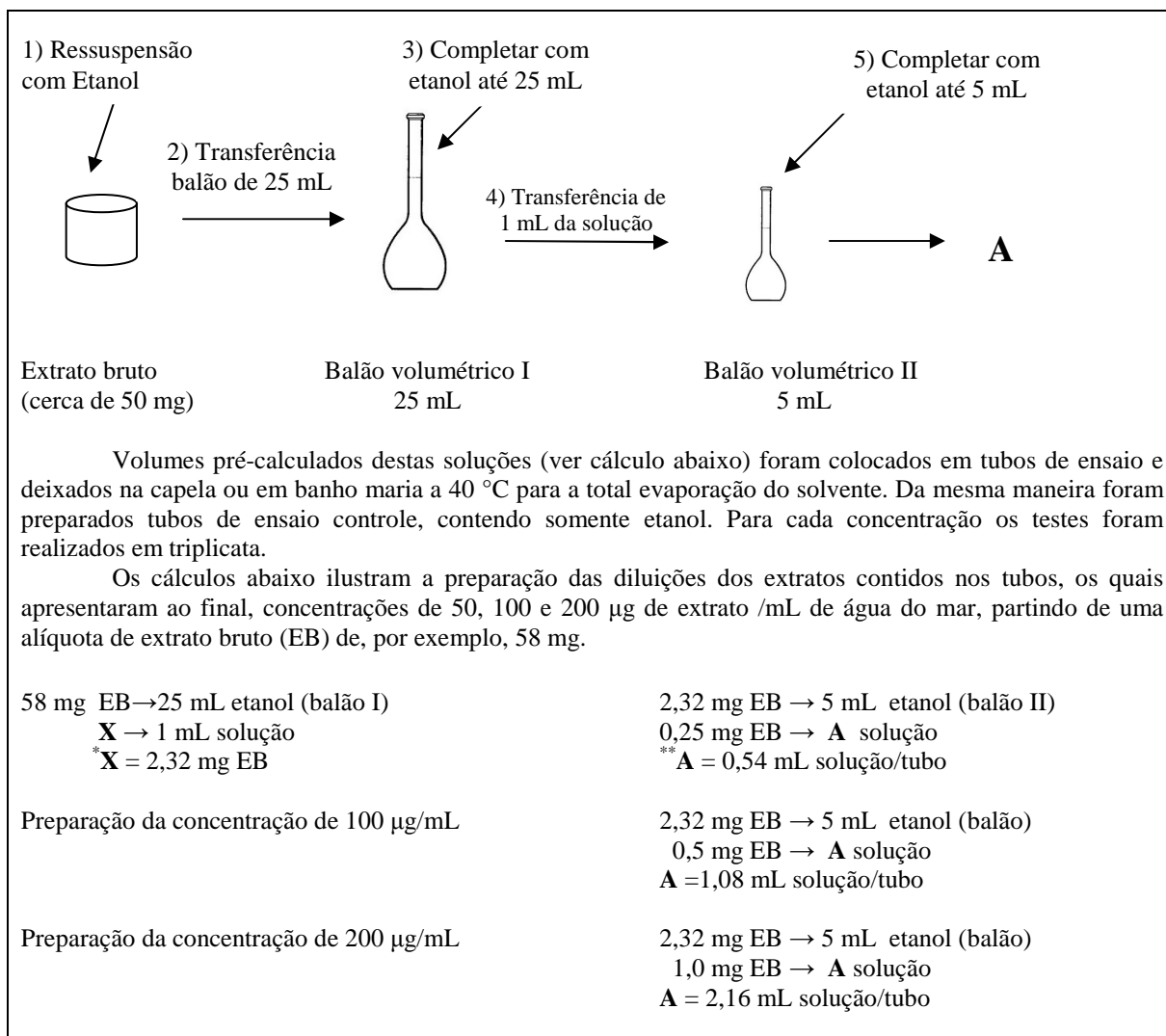


Figura 2. Esquema representativo da preparação das diluições dos extratos para obtenção das concentrações finais.

***X**: representa alíquota de solução etanólica do extrato bruto (EB) a ser transferida para o balão volumétrico II.

****A**: representa o volume da 2ª diluição (balão volumétrico II) a ser transferida para cada tubo de ensaio da série de 50 µg/mL. O volume de **A** contém 0,25 mg de EB (= 250 µg) que estão ao final, dissolvidos em 5 mL de água do mar, ou seja, 250 µg/5 mL equivalem a 50 µg/mL de água do mar.

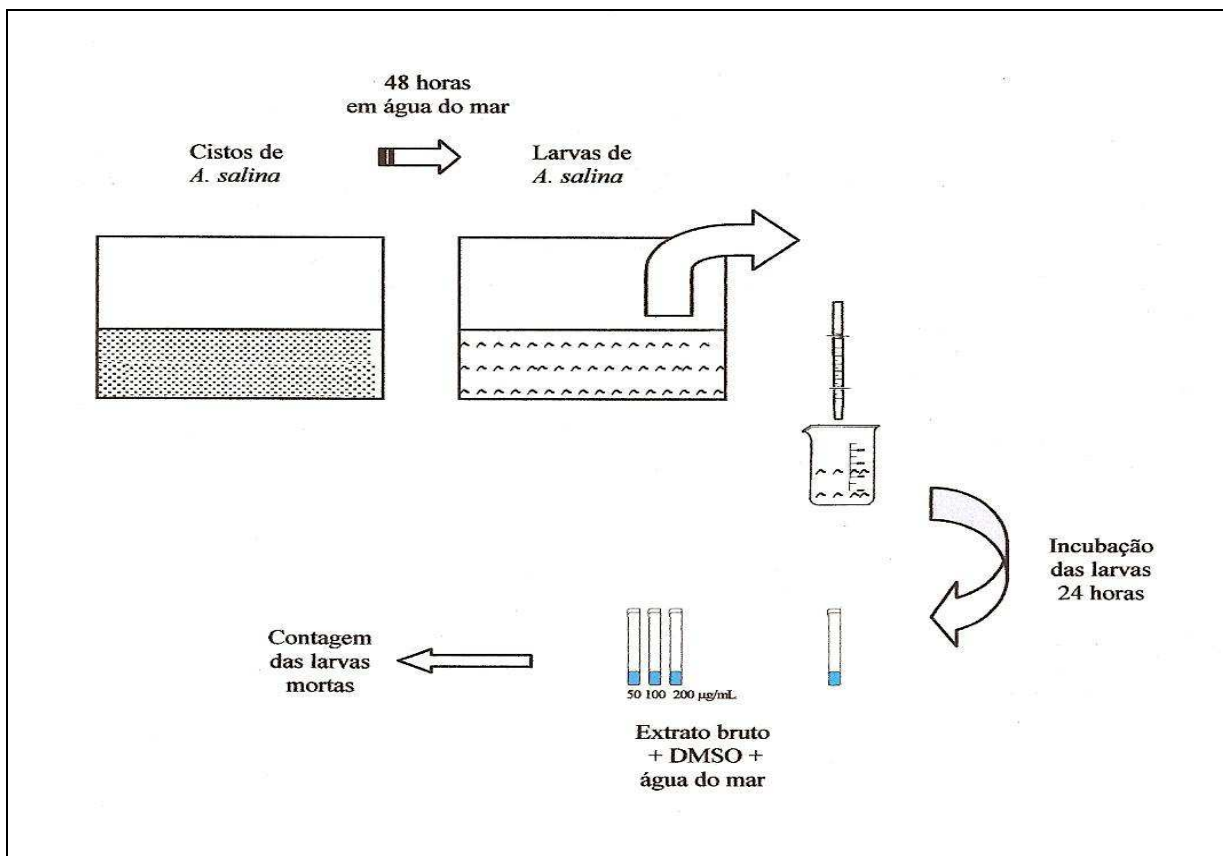


Figura 3. Sequência das etapas para o bioensaio com *Artemia salina* Leach.

3.10. Análise estatística

A comparação entre duas médias foi feita utilizando-se teste t de Student e entre três médias, utilizando-se análise de variância, seguida de teste de Tukey. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa Statistica (STATISOFT, 2001).

Para dados qualitativos da cromatografia foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com auxílio do programa Statistica, sendo os resultados comparados dois a dois (100% com 70% e 100% com 20%). Os dados do bioensaio com *A. salina* foram analisados pelo teste de qui-quadrado (χ^2), tabela de contingência 2X2, utilizando a correção de Yates, sendo considerados significativos para $\alpha = 0,05$ (portanto mais tóxicos que o controle) os valores de χ^2 maiores ou iguais a 3,84 (CENTENO, 1990). Para análise estatística da CL₅₀ dos extratos etanólicos foi utilizando o aplicativo computacional PROBIT (USEPA, 2000), considerando-se as três concentrações (LHULLIER, 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos de diferentes intensidades de luz no crescimento de plantas

Houve um maior incremento de biomassa nas raízes quando as plantas estavam em maior exposição à luz. Em 100% de luz a massa seca das raízes foi 1,43 g. Em 20% de luz a massa seca das raízes foi 0,78 g (tabela 1).

A área foliar em 100% de luz foi menor do que plantas crescidas em ambiente de menor irradiância, como em 20% de luz. Em 100% de luz a área foliar foi de 399,65 cm², em 70% de luz a área foliar foi de 558,69 cm² e em 20% de luz a área foliar foi 682,67 cm² (tabela 1).

Tabela 1. Massa seca e área foliar de plantas de *Cordia curassavica* crescidas sob diferentes intensidades de luz.

Dias de tratamento	Níveis de luz	Folha (g)	Caule (g)	Parte Aérea (g)	Raiz (g)	Total (g)	Área Foliar (cm ²)
0	-----	0,05 (±0,02)	0,02 (±0,008)	0,07 (±0,03)	0,01 (±0,006)	0,08 (±0,04)	27,97 (±10,13)
	100%	2,48 a (±0,74)	1,12 a (±0,40)	3,60 a (±1,11)	1,43 a (±0,49)	5,03 a (±1,54)	399,65 b (±120,66)
72	70%	2,59 a (±0,84)	1,21 a (±0,45)	2,67 a (±1,91)	1,25 ba (±0,53)	5,06 a (±1,81)	558,69 ba (±237,30)
	20%	2,25 a (±0,71)	1,22 a (±0,53)	3,47 a (±1,20)	0,78 b (±0,38)	4,25 a (±1,50)	682,67 a (±180,57)

Zero (0) dias de tratamento refere-se aos dados de plantas antes de serem submetidas aos diferentes tratamentos de luz. Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média.

A taxa média de crescimento relativo (TCR), não foi influenciada pela intensidade de luz. A intensidade de luz influenciou a razão média de área foliar (RAF), sendo maior na intensidade de luz mais baixa e menor nas duas intensidades de luz mais altas. A razão raiz/ parte aérea foi maior a 70% de luz que a 20% de luz, mas similar a 100% de luz (tabela 2).

Tabela 2. Taxa média de crescimento relativo (TCR), razão média de área foliar (RAF) e relação raiz:parte aérea (R:PA) de plantas de *Cordia curassavica* crescidas sob diferentes intensidades de luz.

Intervalo de tempo (dias)	Níveis de luz	TCR (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	RAF (cm ² .g ⁻¹)	R:PA (g)
0 - 72	100%	0,056 a (±0,004)	208,52 b (±5,06)	0,4 ab (±0,07)
	70%	0,056 a (±0,005)	225,25 b (±14,35)	0,5 a (±0,29)
	20%	0,054 a (±0,006)	254,38 a (±22,47)	0,2 b (±0,09)

Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média (R:PA) razão raiz/parte aérea.

4.2. Efeitos de diferentes substratos no crescimento de plantas

Plantas crescidas em diferentes substratos mostraram diferença em relação às massas secas e área foliar. Plantas crescidas em substrato misto (composto por material argiloso, composto orgânico termofílico e areia de rio) apresentaram maior massa seca total e de órgãos e maior área foliar em relação às crescidas em areia de duna (tabela 3).

A TCR e a RAF foram diferentes para plantas crescidas em substrato misto e em areia de duna. O maior valor da TCR foi para plantas crescidas em substrato misto, as quais assimilaram em média (TCR) 0,034 g de matéria seca por dia de crescimento, enquanto que plantas crescidas em areia de duna assimilaram em média (TCR) 0,025 g de matéria seca por dia de crescimento. O maior valor de RAF foi obtido em plantas crescidas em areia de duna, com valor da RAF de 195,05 cm².g⁻¹, enquanto em substrato misto o valor da RAF foi de 187,65 cm².g⁻¹. A razão raiz/parte aérea não foi afetada pelo tipo de substrato (tabela 4).

Tabela 3. Valores de massa seca e área foliar de plantas de *Cordia curassavica* crescidas sob diferentes substratos.

Dias de tratamento	Substratos	Folha (g)	Caule (g)	Parte Aérea (g)	Raiz (g)	Total (g)	Área Foliar (cm ²)
0	-----	0,007 (±0,003)	0,005 (±0,002)	0,013 (±0,004)	0,002 (±0,001)	0,014 (±0,005)	4,67 (±0,96)
201	Substrato misto	4,37 a (±1,95)	3,98 a (±1,77)	8,35 a (±3,63)	4,38 a (±1,29)	12,73 a (±4,71)	559,54 a (±337,58)
	Areia de duna	0,95 b (±0,72)	0,50 b (±0,32)	1,45 b (±1,01)	0,82 b (±0,38)	2,27 b (±1,35)	135,37 b (±103,93)

Zero (0) dias de tratamento refere-se aos dados de plantas antes de serem submetidas aos diferentes tratamentos. Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média.

Tabela 4. Taxa média de crescimento relativo (TCR), razão média de área foliar (RAF) e relação raiz:parte aérea (R:PA) de plantas de *C. curassavica* crescidas sob diferentes substratos.

Intervalo de tempo (dias)	Tipos de substratos	TCR (g.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	RAF (cm ² .g ⁻¹)	R:PA (g)
0 - 201	Solo	0,034 a (±0,003)	187,65 b (±5,85)	0,56 a (±0,17)
	Areia de duna	0,025 b (±0,003)	195,05 a (±8,66)	0,67 a (±0,33)

Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média. (R:PA) razão raiz/parte aérea.

4.3. Efeitos da intensidade de luz nos rendimentos relativos dos extratos vegetais

Os dados de rendimento relativo são vistos na tabela 5. O rendimento relativo do extrato clorofórmico de folhas não foi alterado pela variação da intensidade luminosa, mas a intensidade de luz influenciou o rendimento relativo do extrato em éter de petróleo e em etanol. O rendimento relativo do extrato em éter de petróleo foi maior a 100% de luz que a 70% e 20% de luz. Para o extrato etanólico, observou-se que a 100% e 70% de luz o rendimento relativo foi, aproximadamente, três vezes maior que a 20% de luz.

O rendimento relativo total (soma das médias dos rendimentos relativos dos extratos éter de petróleo, extratos clorofórmicos e extratos etanólicos) foi influenciado pela intensidade luminosa, sendo maior o rendimento relativo total quanto maior a intensidade luminosa.

Tabela 5. Rendimentos relativos dos extratos de plantas crescidas em diferentes intensidades luminosas.

Luz	Extr. clorofórmico Rend. Relativo g ext. bruto/100 g planta	Extr. éter de petróleo Rend. Relativo g ext. bruto/100 g planta	Extr. etanólico Rend. Relativo g ext. bruto/100 g planta	Rend. Relativo Total g ext. bruto/100 g planta
100%	0,59 a (±0,47)	3,17 a (±0,89)	2,36 a (±0,96)	6,12 a (±1,00)
70%	0,45 a (±0,14)	1,61 b (±0,99)	2,20 a (±0,26)	4,26 b (±0,78)
20%	0,51 a (±0,18)	1,28 b (±0,76)	0,77 b (±0,31)	2,56 c (±0,70)

Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média.

4.4. Efeitos do substrato nos rendimentos relativos dos extratos vegetais

O rendimento relativo do extrato clorofórmico também não foi influenciado pela variação do substrato. Já o rendimento relativo do extrato em éter de petróleo e em etanol foi influenciado pelo tipo de substrato, observando-se que em solo os rendimentos relativos foram maiores do que em areia de duna (tabela 6).

O rendimento relativo total (soma das médias dos rendimentos relativos dos extratos éter de petróleo, extratos clorofórmicos e extratos etanólicos) apresentou diferença significativa entre os tratamentos, mostrando ser influenciado pelo tipo de substrato. Plantas cultivadas em solo obtiveram rendimento relativo maior do que plantas crescidas em areia de duna (tabela 6).

Tabela 6. Rendimentos relativos de extratos de plantas de *Cordia curassavica* crescidas em diferentes substratos.

Substratos	Extrato clorofórmico g ext. bruto/100 g planta	Extrato éter de petróleo g ext. bruto/100 g planta	Extrato etanólico g ext. bruto/100 g planta	Rendimento Relativo Total g ext. bruto/100 g planta
Solo	1,24 a ($\pm 0,15$)	4,30 a ($\pm 1,11$)	8,15 a ($\pm 1,74$)	13,69 a ($\pm 2,83$)
Areia de duna	0,79 a ($\pm 0,65$)	2,25 b ($\pm 1,71$)	5,04 b ($\pm 2,08$)	8,00 b ($\pm 2,69$)

Letras comparam médias dentro das colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média.

4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD) de extrato etanólico

4.5.1. Intensidade das manchas na CCD para extratos de plantas cultivadas em diferentes intensidades luminosas.

Quando comparados os tratamentos 100% e 20% de luz, apenas a substância VI apresentou intensidade significativamente diferente, sendo que a 100% de luz a concentração da substância VI foi maior. Quando comparados os tratamentos 100% e 70%, houve diferença estatisticamente significante apenas em relação à substância II, a qual foi mais intensa a 70% de luz. Apenas dois extratos de plantas cultivadas, a 70% de luz apresentaram na CCD manchas que pudessem ser atribuídas ao ácido rosmarínico, aplicado como padrão (tabela 7).

Tabela 7. Intensidade das diferentes substâncias detectadas na cromatografia em camada delgada, para extratos etanólicos preparados a partir de plantas de *Cordia curassavica* crescidas em diferentes intensidades luminosas.

LUZ	Subst I	Subst II	Subst III	Subst IV	Subst V	Subst VI	Subst VII	Subst VIII	Subst IX	Ac. rosm
100%	+1 (7) +3 (2)	+1 (9) *	0 (9)	0 (4) +1 (2) +3 (3)	0 (4) +1 (2) +3 (3)	0 (2) +1 (1) +2 (2) +3 (4) **	0 (5) +1 (4)	0 (7) +1 (2)	0 (7) +1 (2)	0 (9)
70%	+1 (1) +2 (8)	+1 (3) +3 (3) +4 (3) *	0 (8) +1 (1)	0 (4) +1 (3) +3 (1) +4 (1)	0 (7) +1 (1) +3 (1)	0 (3) +1 (2) +3 (4)	0 (9)	0 (6) +1 (2) +3 (1)	0 (8) +1 (1)	0 (7) +1 (2)
20%	+1 (6) +3 (2)	0 (4) +1 (1) +3 (3)	0 (6) +1 (2)	0 (5) +1 (3)	0 (8)	0 (4) +1 (3) +2 (1) **	0 (4) +1 (4)	0 (8)	0 (8)	0 (8)

Valores à esquerda e em negrito representam a intensidade da mancha: 0 mancha ausente, +1 mancha presente em baixa intensidade, +2 mancha presente em intensidade média, +3 mancha presente em intensidade alta, +4 mancha presente em intensidade muito alta. Valores entre parênteses representam a quantidade de amostras, sob mesmo tratamento, que apresentaram a mesma intensidade para cada substância. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney comparando os tratamentos 100% com 70% de luz e 100% com 20% de luz. (*p = 0,014 , ** p = 0,046).

4.5.2. Intensidade das manchas na CCD para extratos de plantas cultivadas em diferentes substratos

Não houve diferença estatisticamente significativa para a intensidade das manchas das substâncias em plantas crescidas em diferentes substratos (tabela 8).

Tabela 8. Intensidade das diferentes substâncias detectadas na cromatografia em camada delgada, para extratos etanólicos preparados a partir de plantas de *Cordia curassavica* crescidas em diferentes substratos.

Solo	Subst I	Subst II	Subst III	Subst IV	Subst V	Subst VI	Subst VII	Subst VIII	Subst IX	Subst X	Ac rosm
Solo	0 (3) +1 (5) +3 (1)	0 (4) +1 (5)	0 (7) +1 (2)	0 (7) +1 (2)	0 (6) +2 (2) +3 (1)	0 (8) +3 (1)	0 (3) +1 (5) +3 (1)	0 (2) +1 (2) +2 (3) +3 (2)	0 (6) +1 (3)	+1 (4) +3 (5)	0 (6) +1 (3)
Areia de duna	0 (2) +1 (7)	0 (8) +1 (1)	0 (9)	0 (9)	0 (5) +1 (1) +2 (3)	0 (9)	+1 (9)	0 (5) +2 (4)	0 (5) +1 (4)	+1 (5) +3 (4)	0 (8) +1 (1)

Valores à esquerda e em negrito representam a intensidade da mancha: 0 mancha ausente, +1 mancha presente em baixa intensidade, +2 mancha presente em intensidade média, +3 mancha presente em intensidade alta. Valores entre parênteses representam a quantidade de amostras, sob mesmo tratamento, que apresentam a mesma intensidade para cada substância. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney comparando os tratamentos solo misto e areia de duna.

4.5.3. Número de metabólitos majoritários detectados na CCD dos extratos etanólicos das folhas de plantas crescidas em diferentes intensidades de luz ou substratos

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de metabólitos detectados na CCD do extrato etanólico de folhas de *C. curassavica* em nenhum experimento (tabela 9).

Tabela 9. Número de metabólitos majoritários visualizados em CCD dos extratos etanólicos de plantas de *Cordia curassavica* crescidas em diferentes intensidades luminosas ou substratos

Tratamento	Número de metabólitos majoritários
100% de luz	5 a ($\pm 2,24$)
70% de luz	4,67 a ($\pm 2,24$)
20% de luz	2,75 a ($\pm 1,91$)
Tratamento	Número de metabólitos majoritários
Solo	5,56 A ($\pm 3,00$)
Areia de Duna	4,33 A ($\pm 1,87$)

Letras comparam médias dentro de cada experimento. Letras minúsculas referem-se ao experimento de luz e letras maiúsculas referem-se ao tratamento de substrato. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (comparando três médias) e pelo teste t de student (comparando duas média). Dados entre parênteses mostram o desvio padrão referente a média.

Pode-se observar, entretanto, uma grande heterogeneidade em relação ao número de metabólitos presentes em cada amostra.

As tabelas 10 e 11 mostram o número de metabólitos presentes em cada amostra.

Tabela 10. Dados individuais do número de metabólitos visualizados, em cada amostra, na CCD do extrato etanólico de folhas de *Cordia curassavica*, cultivadas em diferentes intensidades luminosas.

Intensidades de Luz	Amostras	Nº Metabólitos
100%	1 (3B)	7
	2 (3C)	2
	3 (3F)	6
	4 (4C)	7
	5 (4D)	7
	6 (4E)	4
	7 (5B)	2
	8 (5E)	3
	9 (5F)	7
Média		5
Desvio padrão		± 2,24
70%	1 (6D)	7
	2 (6E)	8
	3 (7D)	4
	4 (7E)	2
	5 (7F)	2
	6 (8A)	7
	7 (8B)	3
	8 (8C)	4
	9 (6F)	5
Média		4,7
Desvio padrão		± 2,24
20%	1 (1D)	1
	2 (1E)	3
	3 (1F)	3
	4 (2C)	5
	5 (2D)	6
	6 (9C)	1
	7 (9E)	1
	8 (9A)	2
Média		2,75
Desvio padrão		± 1,91

Na coluna Amostra, número e letra entre parênteses representam, respectivamente, a unidade amostral e o indivíduo.

Tabela 11. Dados individuais do número de metabólitos visualizados, em cada amostra, na CCD do extrato etanólico de folhas de *Cordia curassavica*, cultivada em substratos diferentes.

Substratos	Amostras	Nº Metabólitos
solo	1	3
solo	2	7
solo	3	9
solo	4	1
solo	5	9
solo	6	8
solo	7	2
solo	8	6
solo	9	5
média		5,56
desvio padrão		$\pm 3,00$
areia duna	10	3
areia duna	11	6
areia duna	12	2
areia duna	13	3
areia duna	14	3
areia duna	15	6
areia duna	16	7
areia duna	17	6
areia duna	18	3
média		4,33
desvio padrão		$\pm 1,87$

Em plantas de *C. curassavica* crescidas em diferentes intensidades de luz foi possível visualizar, em CCD do extrato etanólico, a existência de nove substâncias químicas (figura 4), enquanto que em plantas crescidas em substratos diferentes foi possível detectar dez substâncias químicas (figura 5).

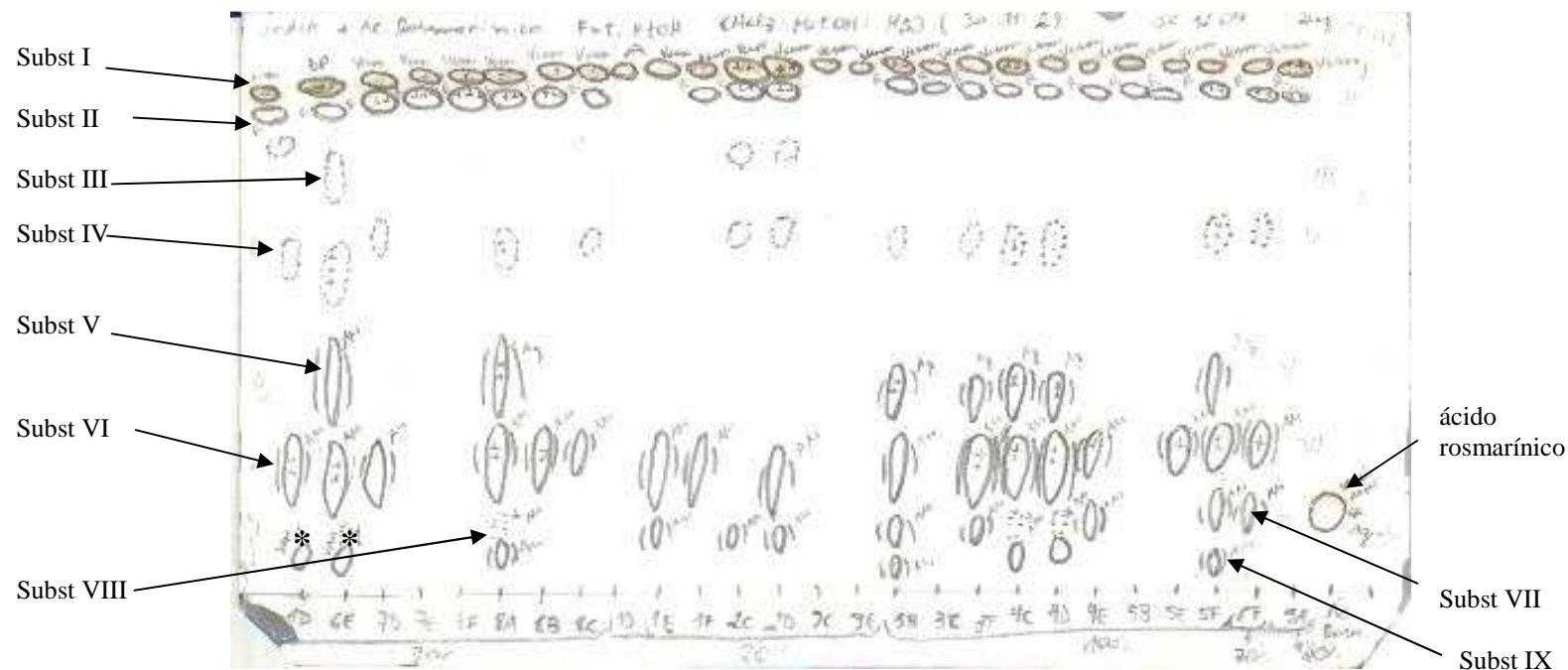


Figura 4. Cromatografia em camada delgada de extratos etanólicos de plantas cultivadas em diferentes intensidades de luz. Placa de gel de sílica eluída em clorofórmio, metanol e água na proporção 30:11:2 e observada após revelação com anisaldeído-sulfúrico.

Legenda:

Linha tracejada representa substâncias que apresentaram extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Linha contínua representa substâncias que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm, antes da revelação com anisaldeído-sulfúrico. Linha contínua entre parênteses representa substâncias que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm após revelação com anisaldeído-sulfúrico. Manchas assinaladas com (*) provavelmente correspondem ao ácido rosmarínico, que apresentou fluorescência azul e coloração verde-amarelada após a revelação da placa.

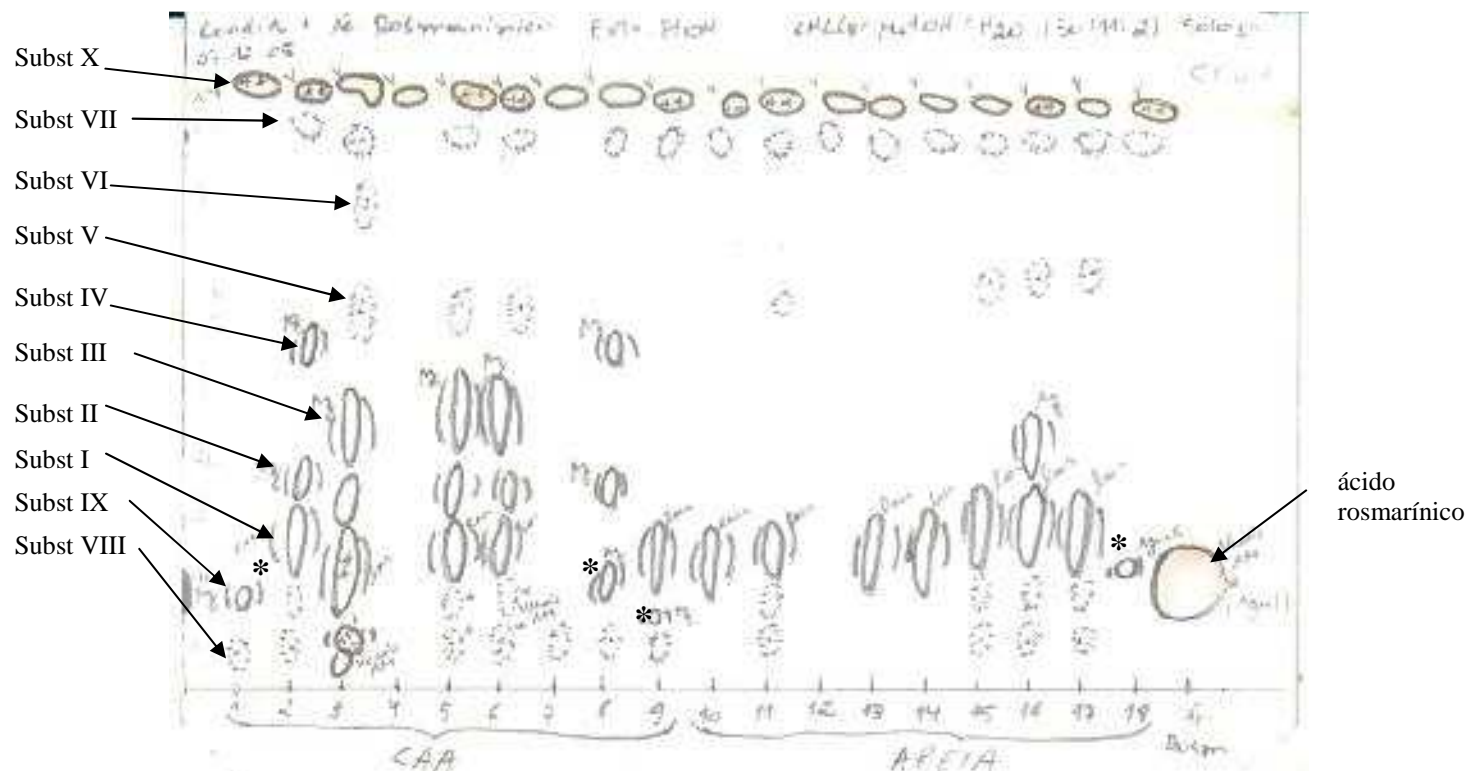


Figura 5. Cromatografia em camada delgada de extratos etanólicos de plantas cultivadas em diferentes substratos. Placa de gel de sílica eluída em clorofórmio, metanol e água na proporção 30:11:2 e observada após revelação com anisaldeído-sulfúrico.

Legenda:

Linha tracejada representa substâncias que apresentaram extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Linha contínua representa substâncias que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm, antes da revelação com anisaldeído-sulfúrico. Linha contínua entre parênteses representa substâncias que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm após revelação com anisaldeído-sulfúrico. Manchas assinaladas com (*) provavelmente correspondem ao ácido rosmarínico, que apresentou fluorescência azul e coloração verde-amarelada após a revelação da placa.

4.6. Atividade biológica do extrato etanólico: toxicidade para larvas de *Artemia salina*

A intensidade luminosa mostrou ter influência na toxicidade do extrato etanólico de *C. curassavica*. Houve diferença significativa na CL₅₀ do extrato de plantas crescidas nas diferentes intensidades luminosas. Plantas crescidas sob 100% e 20% de luz mostraram toxicidade similar. Para extrato de plantas cultivadas a 100% de luz, a toxicidade foi maior que a 70% (figura 6).

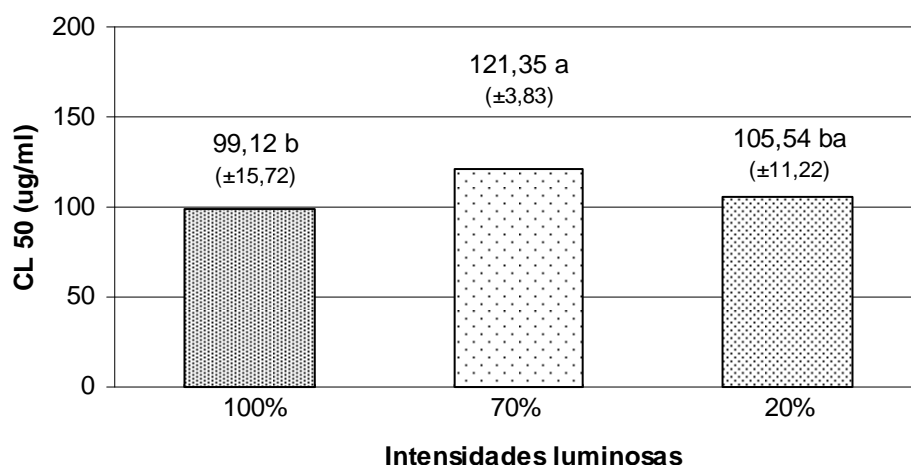


Figura 6. Concentração Letal Média (CL₅₀) de extratos etanólicos de plantas cultivadas em

100% de luz, 70% de luz e 20% de luz.

Letras comparam médias entre as colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Folhas coletadas aos 72 dias de crescimento.

A toxicidade dos extratos das plantas parece não ter sido afetada de forma estatisticamente significativa pelos diferentes substratos utilizados (figura 7).

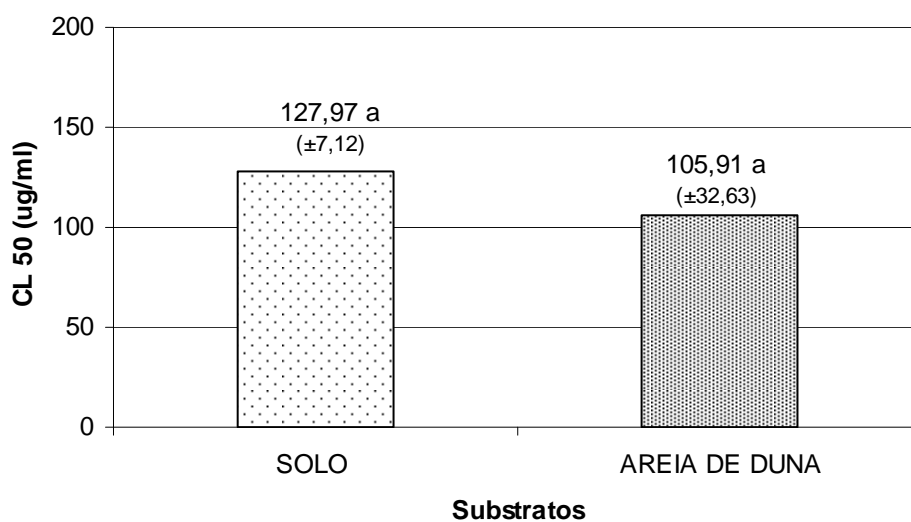


Figura 7. Concentração Letal Média (CL₅₀) de extrato etanólico de plantas cultivadas em areia de duna e solo (composto orgânico, areia de rio e solo argiloso).

Letras comparam médias entre as colunas. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student. Folhas coletadas aos 201 dias de crescimento.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeitos de diferentes intensidades de luz no crescimento de plantas

Aclimação à variação na irradiância é dependente da capacidade da planta em alterar tanto a alocação de massa seca como a capacidade fotossintética, de maneira a obter o maior ganho de carbono na irradiância dada (OSUNKOYA *et al.*, 1994).

C. curassavica em baixa irradiância mostrou menor razão R:PA e maior RAF que plantas em irradiância mais alta, aclimação esta que reflete um aumento potencial para a captura de luz e é importante para manter o crescimento e a sobrevivência das plantas em baixa irradiância (GIVNISH, 1988). Em alta intensidade de luz, diminuiu a área foliar e aumentou a razão R:PA, alteração que reflete a aclimação a alta irradiância, pois estes dois ajustamentos levam, no primeiro caso à diminuição da transpiração e no segundo, ao aumento de captação de água.

A taxa de crescimento relativo, TCR, é produto da taxa de assimilação líquida, TAL⁶, pela razão de área foliar, RAF, (HUNT, 1982). O aumento da RAF em baixa irradiância possibilitou às plantas a apresentarem TCR similar às plantas sob alta irradiância, compensando a baixa TAL ocorrida em intensidade de luz mais baixa.

⁶ Expressa a capacidade fotossintética

5.2 Efeitos de diferentes substratos no crescimento de plantas

Na natureza a *C. curassavica* vegeta preferencialmente em terrenos arenosos, como restingas, dunas e praias (MONTANARI, 2000), em local exposto à luz solar plena.

Neste experimento plantas de *C. curassavica* cultivadas a pleno sol em substrato composto de solo argiloso, composto orgânico termofílico e areia de rio obtiveram maiores índices de crescimento em relação às plantas crescidas em areia de duna. O que está de acordo com MONTANARI (2000), o qual observou que *C. curassavica* necessita de solo fértil para se desenvolver bem.

Este resultado está de acordo com dados obtidos pelo Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agronômicas da UNICAMP, os quais mostraram que para se desenvolver bem *C. curassavica* necessita de solo fértil, levemente ácido e com boa drenagem (MONTANARI, 2000). Também em experimento realizado por MONTANARI *et al.* (1992), a matéria seca de plantas de *C. curassavica* aumentou com a adubação nitrogenada.

A principal fonte de nutriente fornecido pelo composto orgânico termofílico é o nitrogênio (LINDENBERG, 1990). Na planta o nitrogênio faz parte da molécula de clorofila, indispensável à fotossíntese; é constituinte das proteínas vegetais; auxilia a formação de folhagens e no rápido crescimento da planta; é precursor de metabólitos primários (como a purina, a pirimidina e coenzimas) e secundários (alcalóides).

Embora as espécies possam ser sensíveis à diminuição de nutrientes, em geral, apresentam plasticidade para compensar as limitações na disponibilidade nutricional

alterando sua morfologia ou fisiologia (ELLIOT & WHITE, 1994; OSUNKOYA *et al.*, 1994).

Geralmente, em plantas com baixa disponibilidade nutricional, a razão raiz/parte aérea é mais alta para favorecer a absorção de nutrientes (POORTER, 1999), mas *C. curassavica* não mostrou sensibilidade para alterar este parâmetro.

5.3 Efeitos de diferentes intensidades de luz na composição e atividade dos extratos de *C. curassavica*

5.3.1. Rendimento de extratos

Metabólitos lipofílicos são extraídos por solventes apolares, como éter de petróleo e clorofórmio, enquanto metabólitos hidrofílicos são melhor extraídos por solventes polares, como etanol e água (HARBORNE, 1984). A extração realizada iniciou com o solvente mais lipofílico (éter de petróleo), seguindo-se a extração com um solvente de polaridade intermediária (clorofórmio) e finalizando com a extração por um solvente mais polar (etanol). Este tipo de extração sequencial, com aumento gradual da polaridade, permite que metabólitos de polaridades variadas sejam extraídos separadamente do material vegetal e é, por isto, muito utilizado em estudos de investigação fitoquímica, e quando se realiza extrações em grande escala.

O maior rendimento do extrato éter de petróleo em 100% de luz, quase o dobro em relação a 70% de luz (tabela 5), sugere que a pleno sol haja maior produção de metabólitos apolares ou lipofílicos. Embora os rendimentos relativos dos extratos clorofórmicos não tenham apresentado diferença estatisticamente significativa em função da luz, estes extratos possivelmente apresentariam, caso não tivesse sido adotada a extração sequencial, os mesmos componentes extraídos com éter de petróleo, além de outros compostos de média polaridade. Assim, KAUFFMANN (2002) obteve em

extrações não-sequenciais de folhas de *C. curassavica* maior rendimento relativo com diclorometano (que tem polaridade semelhante à do clorofórmio) do que com éter de petróleo, para amostras coletadas em três locais diferentes.

O maior rendimento de componentes lipofílicos sugere a possibilidade de que também componentes do óleo volátil da planta tenham sua produção aumentada. Um componente do óleo essencial, o α -humuleno, foi utilizado para padronização do fitoterápico à base de *C. curassavica* produzido pelo laboratório Aché (RAMOS, 2005).

CARVALHO Jr. *et al.* (2004) identificaram os 12 componentes (de 43 detectados) presentes em maior concentração no óleo de *Cordia curassavica*. O rendimento do óleo foi em torno de 0,2 mL de óleo essencial por 100 g de material vegetal.

Na época da elaboração do projeto não era de conhecimento público a importância do α -humuleno, como substância antiinflamatória presente na *C. curassavica*. Portanto a análise dos óleos não chegou a ser cogitada na ocasião. Considerando que o α -humuleno estava presente no óleo em um percentual inferior a 5%, percebe-se que este metabólito não é majoritário em *C. curassavica* e que mesmo a sua detecção cromatográfica nos extratos lipofílicos não seria fácil, uma vez que nos extratos, além de componentes voláteis, também são encontrados os fixos (não-voláteis).

O baixo rendimento de óleo essencial e a conseqüente exigência de grandes quantidades de material vegetal, bem como o fato de ser esta extração bem mais complexa, que a extração com solventes orgânicos, inviabilizou a inclusão da análise de α -humuleno no âmbito do presente trabalho.

Os rendimentos dos extratos etanólicos de plantas a 100% de luz foram maiores em relação a 70% e 20% de luz, mas a diferença foi estatisticamente significativa apenas

em relação a 20%. Isto sugere que a produção de metabólitos mais polares também aumenta com a exposição à luz.

Considerando-se as somas dos três rendimentos, o tratamento com 100% de luz rendeu em média 6 g de extratos diversos por 100 g de folhas frescas, enquanto os tratamentos de 70% e 20% de luz renderam, respectivamente, em torno de 4,3 g e 2,6 g de extratos a partir de 100 g de folhas frescas (tabela 5). Estes valores evidenciam que a produção de metabólitos para *C. curassavica* aumenta com a exposição da planta a altas intensidades de luz.

5.3.2. Produção de metabólitos majoritários

A maior produção de metabólitos parece refletir-se também na tendência de produção de maior número de substâncias em concentrações detectáveis por CCD nos extratos etanólicos (tabela 9). É importante ressaltar que os volumes e concentrações das soluções extrativas aplicadas nas placas foram os mesmos, ou seja, a aplicação das amostras foi padronizada. Embora a análise estatística não tenha apontado diferenças significativas, possivelmente pelo alto desvio padrão, verifica-se que nos tratamentos com maior exposição à luz, os extratos apresentavam de 8 a 9 substâncias presentes em pelo menos uma amostra do grupo, enquanto no tratamento com 20% de luz, no máximo 6 substâncias foram detectadas em pelo menos uma amostra do grupo.

Além disso, a análise do número de metabólitos detectados em cada planta individualmente (tabela 10) permitiu visualizar que no tratamento de 20% de luz, houve 3 amostras nas quais apenas 1 metabólito foi visualizado na CCD e uma amostra em que foram visualizados 6 metabólitos. No tratamento de 70% de luz, duas amostras apresentaram 2 metabólitos, enquanto em apenas uma amostra foram visualizados 8 metabólitos.

No tratamento com 100% de luz houve amostras de extratos com 2 metabólitos e amostras com 7 metabólitos. Pode-se considerar que essa heterogeneidade no número de metabólitos detectados provenha, ao menos em parte, da variabilidade genética uma vez que as plantas foram obtidas a partir de sementes. Na literatura consultada não foram encontrados outros estudos semelhantes, com esta ou outras espécies vegetais. Entretanto a tendência à grande variabilidade intraespecífica de *C. curassavica* já foi sugerida por FIGUEIRA *et al.* (2001), que não observaram “correlação entre indivíduos semelhantes e o teor de óleo obtido”. Foram observadas características como porte, ramificação e florescimento.

Cabe ainda esclarecer que o número relativamente baixo de substâncias visíveis em CCD deve-se ao fato de ter-se optado pelo uso de soluções com extrato de planta em baixa concentração, justamente para se poder visualizar melhor aqueles metabólitos presentes nos extratos em maior concentração (majoritários). A aplicação de soluções mais concentradas dificultaria a descrição e diferenciação das manchas.

5.3.3. Toxicidade dos extratos

O extrato etanólico de *C. curassavica* foi escolhido para a realização do bioensaio com larvas de *A. salina* por diversos motivos. Primeiro, dos três extratos preparados, o etanólico é o mais polar e, conseqüentemente o único que seria possível de solubilização total em água do mar. Em testes realizados com extratos de diversas espécies (FALKENBERG *et al.*, 1999) a solubilidade de extratos apolares mostrou-se muito reduzida em água do mar, requerendo a preparação de soluções de concentrações bem inferiores às preconizadas por MEYER *et al.* (1982). Outro motivo foi o fato do extrato etanólico ser utilizado na medicina popular (AKISUE *et al.*, 1983; SERTIÉ *et al.*, 1991) e ser, em princípio, aquele no qual se esperaria encontrar o ácido rosmarínico.

Esta substância apresenta muitos grupamentos polares, e é um metabólito comum na família Boraginaceae (à qual pertence o gênero *Cordia*) e Lamiaceae (restrito aqui à subfamília Nepetoideae), para o qual foram comprovadas diversas atividades biológicas, como antiviral, antiinflamatória, etc (PETERSEN & SIMMONDS, 2003). Esta substância é considerada uma das responsáveis pelas propriedades do alecrim – *Rosmarinus officinalis* (BRUNETON, 1991). TICLI *et al.* (2003) isolaram-na do extrato metanólico de *C. curassavica*.

O ensaio com *A. salina* é considerado relativamente inespecífico, porém é um indicador de potencial atividade biológica. Por ser de baixo custo, simples e requerer pequena quantidade de extrato é comum sua utilização em estudos investigatórios iniciais. Este ensaio evita que um número maior de animais vertebrados seja sacrificado, o que também seria necessário a aprovação do Comitê de Ética e provavelmente maior quantidade de plantas cultivadas.

Os extratos etanólicos das folhas de *C. curassavica* mostraram-se tóxicos para larvas de *A. salina*, sendo que os extratos de plantas cultivadas em 100% de luz apresentaram maior toxicidade (menor valor de CL₅₀) que os demais. Estatisticamente os valores de CL₅₀ foram diferentes apenas dos extratos de plantas cultivadas em 70% de luz. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre as CL₅₀ dos extratos de 100% e 20% de luz surpreende, considerando-se que nos demais aspectos avaliados, os extratos de 20% apresentaram menor rendimento relativo e menor número de metabólitos detectáveis em CCD. Isto poderia ser explicado pela hipótese da presença de substâncias com alta potência, em concentrações relativamente baixas no extrato 20%, que não chegam a ser visualizados nas condições experimentais. Outra possibilidade, complementar à anterior, seria que estas mesmas substâncias pudessem

estar sendo, também no extrato de plantas crescidas em 100% de luz, as responsáveis pela toxicidade verificada.

5.4. Efeitos de diferentes substratos na composição e atividade dos extratos de *C. curassavica*

5.4.1. Rendimento de extratos

Houve diferenças estatisticamente significantes entre os rendimentos relativos dos extratos em função do tipo de substrato usado no cultivo (tabela 6). Esta diferença novamente não ocorreu apenas em relação aos extratos clorofórmicos, possivelmente pelas mesmas razões já expostas na discussão do item 5.3.1. A média dos rendimentos dos extratos clorofórmicos de solo foi cerca de 50% superior à média do rendimento em areia de duna, mas estas últimas amostras apresentaram elevado desvio padrão, o que pode também ter contribuído para a falta de significância estatística. Os outros rendimentos relativos obtidos tiveram o maior valor em plantas cultivadas em solo composto (areia de rio, composto orgânico termofílico e solo argiloso). Outros autores observaram um aumento de artemetina e de hidroxiartemetina com o incremento de adubo no solo de cultivo (MONTANARI *et al.*, 1992).

Percebe-se que, de maneira geral, os rendimentos relativos dos extratos no experimento de substratos foram maiores que nos experimentos de luz. Isto pode ser explicado pelo fato de que os tempos de coleta foram bem diferentes: 72 dias nos tratamentos de luz e 201 dias nos de substratos. Como a produção de metabólitos tende a ser maior próxima à floração (MONTANARI, 2000), entende-se que as plantas após 201 dias estivessem mais próximas deste evento.

5.4.2. Produção de metabólitos majoritários

Como pode ser visto nas tabelas 9 e 11 e figura 5, não houve diferença estatisticamente significativa na média do número de metabólitos majoritários visualizados nas análises dos extratos etanólicos para CCD. Neste experimento com variação de substratos, também se percebeu a variabilidade intra-grupo, uma vez que os extratos das amostras cultivadas em solo apresentaram de 1 a 9 metabólitos majoritários que foram visualizados, enquanto nas amostras cultivadas em areia de duna, este número variou de 2 a 7.

Três amostras de plantas cultivadas em solo apresentaram na CCD manchas que, pelo comportamento cromatográfico, correspondem possivelmente ao ácido rosmarínico (figura 5), enquanto apenas uma amostra do grupo de plantas cultivadas em areia de duna apresentou tal substância.

Cabe ressaltar que a posição destas manchas no cromatograma (atributo conhecido como R_f , que relaciona a distância percorrida pela mancha desde o ponto de aplicação da amostra com a distância total até o fronte do solvente) não se reproduziu perfeitamente, em comparação com o R_f do padrão aplicado de ácido rosmarínico. Entretanto o R_f é passível de alteração em função de fatores como a concentração da própria substância e a presença de outras substâncias em uma amostra complexa. À parte das variações de R_f , a reação do ácido rosmarínico com o anisaldeído-sulfúrico produziu um derivado de cor verde-amarelada, o que ocorreu com apenas algumas substâncias em R_f próximo ao do ácido rosmarínico. Não se pode excluir a possibilidade de que os metabólitos em questão sejam outras substâncias muito semelhantes ao ácido rosmarínico, ao invés do próprio.

5.4.3. Toxicidade dos extratos etanólicos

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de CL₅₀ dos extratos provenientes dos diferentes substratos.

Entre as amostras cultivadas em areia, a amostra 16 apresentou o menor valor de CL₅₀ (83 µg/mL) sendo a única do grupo em que foi visualizada a substância II em Rf 0,35, com fluorescência azul após revelação com anisaldeído-sulfúrico. Assim, é possível que esta substância, visualizada também nos extratos de várias amostras cultivadas em solo, esteja envolvida na toxicidade para larvas de *Artemia salina*. A mesma substância foi detectada também nos experimentos de luz (figura 4), sendo mais encontrada em amostras do tratamento com 100% de luz (codificada como substância V). O fato de que os extratos do tratamento com 100% de luz terem apresentado menor valor médio de CL₅₀ (portanto maior toxicidade) reforça a hipótese acima levantada.

6. CONCLUSÕES

A finalidade deste estudo foi identificar fatores que aumentam a produtividade no cultivo de *Cordia curassavica*. A pesquisa tem por objetivo analisar a influência de fatores ambientais no crescimento e na produção de metabólitos dessa planta.

A pesquisa estudou três variações da intensidade de luz (100%, 70% e 20%) e dois substratos de cultivo (a do habitat natural – areia de duna e um substrato enriquecido composto de solo argiloso, areia de rio e composto orgânico termofílico).

Os resultados da pesquisa indicam que:

- i. A espécie mostrou sensibilidade para diminuir a transpiração em maior intensidade de luz (diminuiu a área foliar e a RAF), e aumentar a captação de luz em locais sombreados (aumentou a área foliar e a RAF).
- ii. A espécie não mostrou sensibilidade para alterar a produção de metabólitos extraíveis em clorofórmio em relação à variação de luz.
- iii. A espécie mostrou sensibilidade para alterar a produção de metabólitos extraíveis em éter de petróleo e em etanol, cujos rendimentos relativos aumentaram com o aumento de luz.
- iv. Das 9 substâncias detectadas na CCD apenas a intensidade da substância II e da substância VI foram afetadas de forma estatisticamente significativa pela diferença de intensidade luminosa.
- v. A variação na intensidade de luz não afetou, de forma estatisticamente significativa, o número de metabólitos majoritários detectáveis na CCD.
- vi. A variação na intensidade de luz gerou níveis de toxicidades diferentes: cortes de luz diminuem a toxicidade; porém parece que as relações de toxicidade não são crescentes com cortes de luz maiores.
- vii. *C. curassavica* embora nativa de ambiente de restinga (solo nutricionalmente pobre) foi capaz de aumentar a produção de biomassa com o aumento de disponibilidade de nutrientes.
- viii. O aumento da nutrição mineral aumentou a produção de metabólitos (aumento do rendimento relativo total).
- ix. O número de metabólitos majoritários presentes nos extratos etanólicos e as toxicidades desses extratos não diferiram de forma estatisticamente significativa entre areia e solo fertilizado, verificando-se grande heterogeneidade dentro dos tratamentos.

Os resultados dessa pesquisa sugerem que *C. curassavica* deve ser cultivada:

(1) a pleno sol, pois nessa condição há maior crescimento da planta, maior produção de biomassa, maior produção de metabólitos e o maior efetividade do extrato etanólico.

(2) em solo fertilizado, tendo em vista que houve maior crescimento da planta, maior produção de biomassa, embora a produção de metabólitos e a efetividade do extrato etanólico não sofreram alterações em relação a adubação.

Os resultados alcançados podem colaborar para o aumento da produção da espécie em pequena escala por pequenos produtores e conseqüentemente, um sucesso maior em termos de qualidade e de comercialização para os mesmos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M.S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* A. DC.- BORAGINACEAE. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.5, p.69-82. 1983.
- ANTÔNIO, Jr.A.S. **Plantas medicinais e aromáticas**. Apostila do curso de extensão Epagri. Itajaí. 1997. 75 p.
- ARNT, R. Tesouro verde. **Revista Exame**. São Paulo: ano 35, n.9, p. 52-64. 2001.

- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; OSHIRO, T.; CALY, K.D.V.; PANIZZA, S. Topical anti-inflammatory activity and toxicity of *Cordia verbenacea*. **Fitoterapia**. v.60, n.3, p.260-263. 1989.
- BERNÁTH, J. Production ecology of secondary plant products. In: CRACKER, L. E. & SIMON, J.E. (eds.): **Herbs, Spices and Medicinal Plants. Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology**. New York: Haworth Press, v.1, p. 185-234. 1992.
- BRASIL **Resolução-RDC N° 48**, de 16/03/2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br
- BRITO, A.R.M.S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In.: DI STASI, L.C. (org.): **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, p. 99-108. 1996.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, p.137. 1991.
- CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. (eds.): **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos-Ed. Universitária UNOESC, Santa Catarina: Campus Chapecó, p. 297-315. 2001.
- CARVALHO, P.M. Jr.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**. n.95, p.297-301. 2004.
- CASTELLANO, O. **Introdução à fitoterapia: teoria e prática**. São Paulo: CODAC/USP, 1981. 56 p.
- CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. Goiânia: Ed. da UFG, 1982. 188p.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed., Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.
- CROTEAU, R. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In: CRAKER, L.E. & SIMON, J.E. (eds.): **Herbs, spices, and medicinal plants: recents advances in botany, horticulture and pharmacology**. New York: Haworth Press, p. 81-131. 1992.
- ELLIOTT, K. & WHITE, A.S. Effects of light, nitrogen, and phosphorus on red seedling growth and nutrient use efficiency. **Forest Science**, n.40, p. 47-58. 1994.
- EVANS, W.C. **Farmacognosia**. 13^a ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana. 1991. 453p.
- FALKENBERG, M.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Orgs.): **Farmacognosia: da planta ao**

medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Cap. 10. p. 229-245. 2003.

FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**, n. 501, p. 329-332. 1999.

FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P.M.; ALVES, M.N.; MACHADO, M.A.L.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; CANDIDO, C.P. Características morfológicas, fitoquímicas de *Cordia curassavica* e estudo da propagação *in vitro*. In.: **III Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe**, 2001 p. 295-297.

GIVNISH, T.J. Adaptation to sun and shade: a whole plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.93-106. 1988.

GOINGUENÉ, S.P. & TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v.129, p. 1296-1307, 2002.

GUENTHER, A. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. **Ecological Applications**, v.7, n.1, p. 34-45, 1997.

GUNATILLEKE, C.V.S.; GUNATILLEKE, I.A.U.N.; PEREIRA, G.A.D.; BURSLEN, D.F.R.P.; ASHTON, P.M.S. & ASHTON, P.S. Responses to nutrient addition among seedlings of eight closely related species of *Shorea* in Sri Lanka. **Journal of Ecology**, v.85, p.301-311. 1997.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2ª ed. London: Chapman & Hall, p.5. 1984.

HUNT, R. **Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis**. Edward Arnold, London. 1982. 248p.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v.53, p.613-617, 2000.

KAUFMANN, G.T. Investigação fitoquímica de *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. monitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*. **Dissertação de mestrado em Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina**, 2002. 112p.

LARCHER, W. **Ecologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, p. 33-40. 2000.

LHULLIER, C. Triagem de macroalgas bênticas do litoral de Santa Catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* e investigação fitoquímica de *Pterocladia capillacea*. **Dissertação de mestrado em Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina**, 2005. p.89

- LINCOLN, D.E. & LANGENHEIM, J.H. Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. **Biochemistry System Ecology**, v.6, n.21, p.21-32, 1978.
- LINDENBERG, R.C. Compostagem. In: **Resíduos sólidos domésticos: tratamento e disposição final**. São Paulo. São Paulo: CETESB, p.13-72, 1990.
- LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p
- MACHADO, D.L.; FALKENBERG, M.B.; DEL-REI SOUZA, M.L.; FALKENBERG, D.B. Triagem de espécies vegetais da Ilha de Santa Catarina: Pesquisa de quinonas e avaliação da letalidade para larvas de *Artemia salina*. **IX Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis: DAP/PRPG/UFSC, 1999. p.127.
- MAGALHÃES, P.M. [Colheita e secagem de plantas medicinais](http://www.horticiencia.com.br/anais/anais.asp?id=62). **41 ° Congresso brasileiro de olericultura, 2001**. <http://www.horticiencia.com.br/anais/anais.asp?id=62>
- MAGALHÃES, P.M. **O Caminho Medicinal das Plantas: aspectos sobre o cultivo**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 1997. 120 p.
- MATTOS, J.K.A. **Plantas Medicinais, aspectos agronômicos**. Brasília. 1996. 51p.
- McLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: Hostettmann, K. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Academic Press, v.6., p. 1-31, 1991.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.
- MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. DI STASI, L.C. (org.) In: **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, p. 60-86. 1996.
- MONTANARI, Jr.I. [Comercialização de plantas medicinais e tendências do mercado](http://www.horticiencia.com.br/anais/anais.asp?id=61). **41 ° Congresso brasileiro de olericultura, 2001**. <http://www.horticiencia.com.br/anais/anais.asp?id=61>
- MONTANARI, Jr.I; MAGALHÃES, P.M.; FIGUEIRA, G.M; FOGLIO, M.A.; RODRIGUES, R.A.F.; HOPPEN, V.R. & SHARAPIN, N. Aspectos Agronômicos e fitoquímicos do cultivo da baleeira. **Anais do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Curitiba/PR, p.180. 1992.
- MONTANARI, Jr.I. Cultivo comercial de erva-baleeira. **Revista Agroecologia Hoje**. Junho-Julho, p.14-15. 2000.

- NOGUEIRA, J.C.M. & WOLFF, C.K. Na Luta pela Produção Socialmente Saudável – Que Remédio? Acúmulos, Riscos e Potenciais na Inter-relação entre Plantas Medicinais e Agricultura Familiar. IFAS, 2001. http://ifas.org.br/html/mais/t_artigo/dados/producao_socialmente_sust_art_revist2.htm
- ORELLANA, A.D.; PERLA, H.; HERRERA, M. Diagnóstico de Guatemala. In: OCAMPO, R.A. Ed. **Domesticación de plantas medicinales em Centroamérica**. Turrialba: Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza, p. 13-27. 1994.
- OSUNKOYA, O.O.; ASH, J.E.; HOPKINS, M.S. & GRAHAN, A. Influence of seed size and seedlings ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland. **Journal of Ecology**, v. 82, p. 149-163. 1994.
- PEACE, W.S.H. & GRUBB, P.J. Interaction of light and mineral nutrient supply in the growth of *Impatiens parviflora*. **New Phytology**, v.90, p. 127-150. 1982.
- PETERSEN, M. & SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v.62, p.121-125. 2003.
- POORTER, L. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. **Functional Ecology**, v.13 p.396-410. 1999.
- RAMOS, C. *Cordia verbenacea*: planta contra a inflamação **Phytomedica**. Ano.1, n.1, p.1. 2005. <http://www.....>
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001. p.874.
- SÁNCHEZ, JE. *Cordia* subgénero *Varronia* (Boraginaceae). **Flora de Colombia**, v.14, p.1-176, 1995.
- SMITH LB. Boragináceas. In: Reitz R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1970, p.19-20.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (orgs.): **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 403-434. 1999.
- SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.P.; PENNA, S.C. Pharmacological assay of *Cordia verbanacea* III: Oral and topic anti-inflammatory and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, p.239-247. 1991.

- SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 387-415. 1999.
- STATISOFT, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.2001.
- TICLI, F.K., COSTA; S.M.C.; SILVA, J.O.; PEREIRA, P.S.; SAMPAIO, S.V. Isolation and characterization of rosmarinic acid from the plant *Cordia verbanacea*. In.: **Abstracts of the 41º Congress of the European Societies of Toxicology**. Florence, Italy, p.89. 2003.
- TYLER, V.E. **Herbs of choice**. New York: Haworth, 1994.
- USEPA, **Software Probit Analysis Program** v.1.5 (probit.exe), 2000. www.agls.uidaho.edu/etoxiweb/resources/resources.htm
- VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATILDA, A.K.; PANIZZA, S. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbanacea* DC. **Journal of Chemical Society of Perkin Trans.** v.11, p.2697, 1982.
- VITTI, A.M. & BRITO, J.O. Produção de óleo essencial de eucalipto. **IPEF-NOTÍCIAS**, v.23, n.146, p. 11, 1999.